

## 发酵醪中添加酸性蛋白酶对黄酒稳定性的影响

魏桃英<sup>1</sup>, 汪钊<sup>2</sup>, 魏瑞锋<sup>1</sup>

1(浙江工业职业技术学院, 浙江 绍兴, 312000) 2(浙江工业大学, 浙江 杭州, 31000)

**摘 要** 为提高黄酒的稳定性, 在不同发酵阶段加入不同量的酸性蛋白酶, 通过对黄酒糖、酒、酸、氨基酸态氮进行检测分析结果表明, 它们的生成量与加入蛋白酶的量成正比, 对氨基酸态氮的影响最明显。通过冷混浊与强化试验, 发现加入 10~20 U/g 的蛋白酶的黄酒浊度比空白原酒降低了 0.3 左右, 冷混浊的沉淀量比原酒明显减少。这说明发酵时加入蛋白酶能提高黄酒的稳定性。发酵的不同时期加入相同量的酸性蛋白酶对黄酒的理化指标、黄酒稳定性都没有显著的影响, 结合实验数据与企业成本两方面考虑, 选用 15 U/g 的酸性蛋白酶最好。

**关键词** 黄酒; 酸性蛋白酶; 稳定性

黄酒不稳定, 主要是由非生物浑浊引起的, 而非生物浑浊, 一般认为主要是由于酒体中的蛋白质<sup>[1]</sup>或蛋白与多酚类物质(如单宁)相结合而引起的<sup>[2]</sup>或氧化作用、重金属影响<sup>[3]</sup>。黄酒不稳定主要表现在黄酒的冷浑浊与陈酿过程中或瓶装加热后出现沉淀物<sup>[4]</sup>。要提高它的稳定性, 必须降低酒体中蛋白质的含量。首先从蛋白质上着手, 加入蛋白酶来分解原料与微生物中的蛋白质, 从而减少酒体中的蛋白质。啤酒生产中已在用木瓜蛋白酶来提高啤酒的稳定性。借鉴啤酒的方法把木瓜蛋白酶运用到黄酒发酵中来。由于黄酒的 pH 值为 3.7~4.5 左右, 本试验通过向黄酒发酵醪中添加一定比较的酸性蛋白酶, 以期提高黄酒的稳定性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

酸性蛋白酶, 10 万 U/g; 大米, 市售; 酿造用水, 绍兴地区自来水; 安琪酵母(黄酒高活性干酵母), 安琪酵母股份有限公司; 麦曲, 会稽山生产。

### 1.2 主要仪器

HH-6 数显恒温水浴锅, 常州普天仪器制造有限公司, 上海博迅仪器厂; 生化培养箱 BSP-150; 酒精蒸馏仪一套; 离心机; pH-3C 酸度计, 上海精密科学上海雷磁仪器厂; 722 型分光光度计, 上海科晓科学仪器有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 黄酒酿造工艺流程

(1) 大米→浸米→蒸饭→摊冷→投料→添加酸性蛋白酶→前发酵→后发酵→压榨→过滤→杀菌→灌装→贮存

(2) 大米→浸米→蒸饭→摊冷→投料→前发酵→添加酸性蛋白酶→后发酵→压榨→过滤→杀菌→灌装→贮存。

### 1.3.2 操作要点

浸米: 称取粳米 15 kg 于桶中, 加水到浸没米 10 cm, 浸米时间以气温来定, 一般浸到米用手轻捻一下即能粉碎为止。浸米主要是为了让大米吸水膨胀, 蒸饭容易, 一般根据米质情况, 浸渍 24~48 h。

蒸饭: 把浸好的米用纱布包好, 进行蒸汽蒸, 蒸到饭粒疏松不糊, 颗粒完整, 不黏团结块, 成熟均匀一致, 内无白心生粒。

### 1.3.3 酒用酸性蛋白酶的添加方案

添加量 0.5、10、15、20、25 U/g 各 5 个样品试验, 称量所需的蛋白酶与 0.1% 的黄酒活性干酵母, 混匀后接种于蒸好的米饭中, 另外所有条件都相同, 麦曲加量为米的 18%, 水的加量为米的 120%。酸性蛋白酶在添加前用 50 ℃ 热水活化 30 min, 每组做平行试验, 取平均值。

投料后按黄酒生产工艺进行操作。开耙时, 头、二耙可视品温的高低由开耙人掌握, 有案例经验认为头、二耙温度之和不超过 70 ℃ (加酶后不超过 63 ℃)。三、四耙则要结合感官检查, 通过听、看、摸、尝, 判断发酵醪的成熟程度, 及时开耙和降温, 保证发酵正常进行; 四耙以后, 每天捣耙 2~3 次, 直至接近室温。

第一作者: 本科, 副教授(本文通讯作者, E-mail: weitaoying@163.com)。

收稿日期: 2014-11-02, 改回日期: 2015-12-18

适当搅拌可增加酒醅中的氧气,提高酵母活力,抑制杂菌生长,但应注意减少酒精挥发,及时灌坛,进行后发酵。前酵时间一般控制在5 d。进入后发酵阶段,应保持低温,一般品温应控制在15℃,后酵时间在15 d左右,前10天每天至少要搅拌开耙1次,通入新鲜空气,保持酵母活力,使酒体逐渐丰满协调。

#### 1.3.4 总糖的测定<sup>[5]</sup>

#### 1.3.5 酒精度测定<sup>[5]</sup>

#### 1.3.6 酸度与氨基酸态氮的测定<sup>[5]</sup>

#### 1.3.7 酒样稳定性测定

(1)酒样浊度的测定<sup>[6]</sup>:在可见分光光度计上,设定800 nm为测定波长,以澄清的空白同样酒样为参比,将待测定酒样迅速摇匀测定透光率T,以1-T作为黄酒的浊度。

(2)酒样的冷浑浊测定:取杀菌后的酒样50 mL,在0℃冰箱中放置12 h,拿出后快速测定浊度。

(3)酒样强化实验<sup>[7]</sup>:以酒样在0~4℃冰箱内放置12 h,60℃烘箱中放置12 h,2次循环后,取出在常温下800 nm处快速测定透光率T,1-T为其浊度。

(4)乙醇浊度测定<sup>[8]</sup>:在10 mL澄清酒样加入5 mL无水乙醇,用混合器振荡1 min,室温放置2 h,取出后快速测定浊度。

#### 1.3.8 黄酒发酵醪中酵母数的检测

##### 1.3.8.1 方法步骤

(1)稀释:吸取10.0 mL样品于100 mL容量瓶中,加蒸馏水定容后摇匀,即试样。

(2)加样:取洁净干燥的血球计数板1块,在计数区上盖上盖玻片,用1 mL移液管滴1小滴试样,从计数板中间平台两侧的沟槽内沿盖玻片的下边缘滴入一小滴(不宜过多),让试样利用液体的表面张力充满计数区,勿使气泡产生,并用吸水纸吸去沟槽中流出的多余试样。也可以将试样直接滴加在计数区上(不要使计数区两边平台沾上试样,以免加盖盖玻片后,造成计数区深度的升高),然后加盖盖玻片(勿使产生气泡)。静置片刻,使细胞沉降到计数板上,不再随液体漂移。将血球计数板放置于显微镜的载物台上夹稳,先在低倍镜下找到计数区后,再转换高倍镜观察并计数。由于生活细胞的折光率 and 水的折光率相近,观察时应减弱光照的强度。静置2 min。

(3)镜检计数:用400倍显微镜观察。调节显微镜使计数室清晰,计数时若计数区是由16个大方格组成,按对角线方位,数左上、左下、右上、右下的4个大方格(即100小格)的菌数。如果是25个大方格

组成的计数区(如图2),除数上述4个大方格外,还需数中央1个大方格的菌数(即80个小格)。为了保证计数的准确性,避免重复计数和漏记,在计数时,对沉降在格线上的细胞的统计应有统一的规定。如菌体位于大方格的双线上,计数时则数上线不数下线,数左线不数右线,以减少误差。即位于本格上线和左线上的细胞计入本格,本格的下线和右线上的细胞按规定计入相应的格中。对于出芽的酵母菌,芽体达到母细胞大小一半时,即可作为两个菌体计算。每个样品重复计数2~3次(每次数值不应相差过大,否则应重新操作),计算出1 mL菌悬液所含细胞数量。

(4)清洗:测数完毕,取下盖玻片,用水将血球计数板冲洗干净,切勿用硬物洗刷或抹擦,以免损坏网格刻度。洗净后自行晾干或用吹风机吹干,放入盒内保存。

黄酒发酵是多菌种发酵,利用形态与个体的大小来鉴别酵母菌。黄酒酵母菌细胞的形态通常有球形、卵圆形、椭圆形。比细菌的单细胞个体要大得多,一般为1~5 μm×5~30 μm。酵母菌无鞭毛,不能游动。在放大400倍的显微镜下,细菌只能看到很小的一个点,它与黄酒酵母菌很容易区别。至于霉菌一般情况下,它是以菌丝为单位,呈长管状的,很易与黄酒酵母菌区分。

##### 1.3.8.2 计算

16×25规格的计数板:

酒母中的酵母数/(个·mL<sup>-1</sup>) =

$$\frac{100 \text{ 小格细胞酵母数}}{100} \times 400 \times 10\,000 \times \text{稀释倍数}$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 投料时添加不同量的酸性蛋白酶对黄酒的酒精度影响

在黄酒酿造投料时添加不同量的酸性蛋白酶后对黄酒的酒精度生成量的影响见图1。

从图1可知,使用酸性蛋白酶比例越高,则发酵初期的酒度相对也越高。在投料时添加酸性蛋白酶,相当于在培菌阶段添加。添加不同量的酸性蛋白酶对黄酒前4天内的酒精度影响较大,这是因为,在投料时加入酸性蛋白酶,可以快速分解原料中的蛋白质,分解出游离的氨基酸等小分子物质,为酵母生长提供充足的必需营养物,有利于酵母快速繁殖<sup>[7]</sup>。增加酒精发酵的能力,表现为发酵醪的酒度明显提

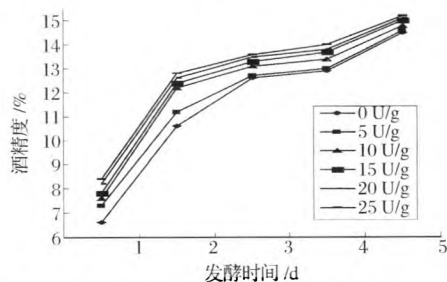


图1 投料时加入酸性蛋白酶酒精度的变化

Fig. 1 Add the change of the acid protease alcohol feeding

高。第1天的各指标检测时间是28 h左右。

## 2.2 投料时添加不同量的酸性蛋白酶对黄酒发酵酵母数的影响

在投料时添加不同量的酸性蛋白酶后对黄酒发酵醪中酵母数的生成量的影响见图2。

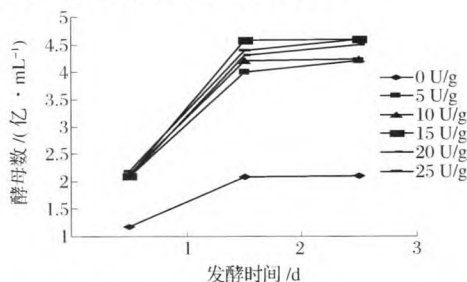


图2 投料时加入酸性蛋白酶黄酒酵母数变化情况

Fig. 2 Feeding when adding acid protease, the change of the number of yellow wine yeast

从图2分析可知,在黄酒生产中通过增加酸性蛋白酶的添加量,可以使酵母细胞数在1 d后增加,到2 d时其酵母数量可翻倍,而没有加酸性蛋白酶的醪液中酵母数2 d检测的数值与添加酸性蛋白酶1 d检测的数值相当,而且也增加到顶峰。黄酒发酵醪中酵母数增加得多,产生酒精的量也相应增加,这与图1的数值相吻合。当然由于酵母数检测时,取样有系统误差与偶然误差存在,不同的酸性蛋白酶添加量与酵母生成量是否有比例关系这一点不能下结论,但加入酸性蛋白酶确实可以增加酵母的数量。

## 2.3 投料时添加不同量的酸性蛋白酶对黄酒发酵醪中酸度的影响

投料时添加不同量的酸性蛋白酶后对黄酒发酵醪中酸度的影响如图3所示。

研究之初加入酸性蛋白酶的量为10,20,30,40,50 U/g,发酵到7天,加入酶量为40,50 U/g的二只酒检测酸度为8.5 g/L,酸度超过GB/T13662-2008黄酒国标7.5 g/L,且有酸臭气,出现了酸败现象。因此减少用酶量,适当降低开耙温度,再进行实验。在投

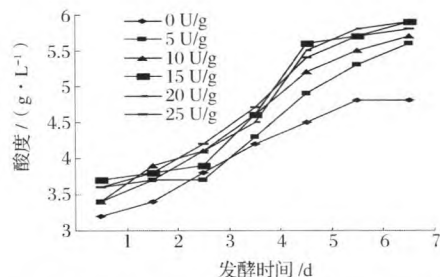


图3 投料时加入酸性蛋白酶发酵醪酸度的变化

Fig. 3 Feeding when adding acid protease fermentation mash acidity change

料时添加不同酸性蛋白酶的酸度变化情况如图3所示,在试验范围内添加的酸性蛋白酶量越多,产生的酸度相对也高,这一方面可能是因为前发酵添加酸性蛋白酶,使醪液的氮源增多,氨基酸含量丰富,不但有利于酵母菌的繁殖与生长,也有利于其他杂菌的生长与繁殖,同时此时醪液酒精度较低,不能抑制杂菌生长,前期产生的生酸菌增加,发酵后期造成酸败,同时黄酒发酵是开放性发酵,酵母菌与乳酸菌是共存的,加入蛋白酶有利于乳酸菌的生长,所以醪液中酸度比没加酸性蛋白酶的黄酒醪液要高。

## 2.4 投料时添加不同量的酸性蛋白酶对黄酒发酵醪中糖含量的影响

投料时添加不同量的酸性蛋白酶对黄酒发酵醪中糖生成量的影响如表1所示。

表1 投料时加入酸性蛋白酶发酵醪糖度的变化

Table 1 Feeding when adding acid protease fermentation mash sugar changes

发酵时间/ d	不同加酶量生成的糖度/(g·L <sup>-1</sup> )					
	0	5 U/g	10 U/g	15 U/g	20 U/g	25 U/g
1	50.6	51.5	52.5	53.0	53.5	54.0
2	30.1	31.5	32.0	32.4	32.8	33.0
3	24.2	24.9	25.5	26.8	27.2	27.4
4	16.7	17.2	17.2	17.8	16.2	15.7
5	10.7	11.9	12.7	12.9	13.4	13.0
10	3.2	3.5	3.7	3.6	3.6	3.7
15	1.1	1.3	1.4	1.4	1.5	1.4

从表1可知,前发酵期加入不同量的酸性蛋白酶,酒样总糖含量略有增加,这可能是因为酸性蛋白酶分解原料较彻底,醪液营养成分更加丰富;另外加酸性蛋白酶的醪液中霉菌数量比没加的醪液霉菌数量多,霉菌分泌出的总的糖化酶与液化酶较多,从而有利于淀粉的分解,使总糖稍高于没加酸性蛋白酶的黄酒醪液。加入适量酸性蛋白酶可以使麦曲的糖化力升高,可能是因为酿酒原料中的淀粉对糖化性淀粉

有吸附作用,加入酸性蛋白酶可以降低吸附能力<sup>[9]</sup>。加入酸性蛋白酶使糖度略有上升,从2.1得出的结论可知,加入适量的酸性蛋白酶使酒精度上升,这是因为葡萄糖作为酒精产生的反应前体,如果前体物质葡萄糖的数量大,反应后剩余的葡萄糖的量也相对较多。

## 2.5 投料时添加不同量的酸性蛋白酶对黄酒理化指标的影响

投料时添加不同量的酸性蛋白酶,发酵结束时黄酒理化指标如表2所示。

表2 投料时加入酸性蛋白酶发酵结束时理化指标

Table 2 Feeding when adding acid protease fermentation at the end of the physical and chemical indicators

项目	投料时加入酸性蛋白酶					
	0	5 U/g	10 U/g	15 U/g	20 U/g	25 U/g
酒精度/%	16.0	16.2	16.5	16.8	16.9	17.0
酸度/(g·L <sup>-1</sup> )	4.9	5.7	5.9	5.9	6.2	6.2
总糖/(g·L <sup>-1</sup> )	1.1	1.2	1.4	1.4	1.5	1.4
非糖固形物/(g·L <sup>-1</sup> )	16.5	17.0	17.6	18.0	18.7	19.5
氨基酸态氮/(g·L <sup>-1</sup> )	0.30	0.40	0.42	0.47	0.52	0.57

## 2.6 前发酵后添加不同量的酸性蛋白酶进行发酵酿造试验分析

投料5 d前发酵后加入不同量的酸性蛋白酶,进行发酵,只是加入酸性蛋白酶的时间不同,另外都与投料时加入酸性蛋白酶的操作相同。到发酵结束时对其理化指标进行检测,前发酵后添加不同量的酸性蛋白酶在黄酒发酵结束时理化指标如表3所示。

表3 前发酵后加入酸性蛋白酶发酵结束时理化指标

Table 3 before fermentation after adding acid protease fermentation at the end of the physical and chemical indicators

项目	前发酵后加入酸性蛋白酶					
	0	5 U/g	10 U/g	15 U/g	20 U/g	25 U/g
酒精度/%	15.8	16.2	16.4	16.7	16.9	17.2
酸度/(g·L <sup>-1</sup> )	4.9	5.7	5.9	5.8	6.1	6.3
总糖/(g·L <sup>-1</sup> )	1.0	1.2	1.3	1.3	1.5	1.4
非糖固形物/(g·L <sup>-1</sup> )	16.0	16.5	17.0	17.3	17.5	18.0
氨基酸态氮/(g·L <sup>-1</sup> )	0.33	0.39	0.41	0.45	0.51	0.56

从表2与表3检测数据可知,投料时加入酸性蛋白酶与前发酵5 d后加入酸性蛋白酶到发酵结束时两者理化指标的差别不大,总的来说酒精度、酸度、氨基酸态氮、非糖固形物生成量与加入酸性蛋白酶的量成正比,对氨基酸态氮的影响最明显,对表3数据进行分析,不加酶的氨基酸态氮含量为0.33,添加

25 U/g酶的氨基酸态氮含量为0.56,氨基酸态氮含量增加了70%,酒精度增加9%,酸度增加了30%,总糖增加了40%,非糖固形物含量增加了13%。从本次研究数据分析可知,除了表2前发酵加入25 U/g酶的非糖固形物比没加酶的增加了18.1%,另外的检测数值都相差不多。从理论上讲,黄酒用酸性蛋白酶的最适作用温度是30℃,在投料时加入的效果比前发酵后加入的效果好。因为后酵温度控制在15℃左右,这有可能会影响酸性蛋白酶的活性。在投料时加入酸性蛋白酶更加方便些,开耙次数多有利于酶与物料接触,使反应均匀,如果在后酵时加入又多了一道工序,所以结合生产情况。在投料时加入与前酵后(发酵5 d后)加入两者相比,只要控制好温度,还是在投料时加入比较好。

## 2.7 添加酸性蛋白酶对发酵酿造的酒样稳定性的影响

不同时间段加入的酸性蛋白酶酿成的酒经过滤后用3种方法来检测酒样的稳定性,检测结果如表4、表5所示。

表4 投料时加入不同量的酸性蛋白酶酒样稳定性比较

Table 4 Feeding with different amount of acid protease liquor stability

项目	投料加入不同酸性蛋白酶酒样					
	0	5 U/g	10 U/g	15 U/g	20 U/g	25 U/g
原始浊度	0.035	0.041	0.045	0.055	0.060	0.067
冷浑浊	+++	++	+	+	+	++
强化后浊度	0.602	0.414	0.305	0.295	0.312	0.453
乙醇浊度测定	0.598	0.440	0.302	0.292	0.308	0.551

表5 后发酵时加入不同量的酸性蛋白酶酒样稳定性比较

Table 5 After fermentation when adding different amount of acid protease liquor stability

项目	后发酵加入不同酸性蛋白酶酒样					
	0	5 U/g	10 U/g	15 U/g	20 U/g	25 U/g
原始浊度	0.030	0.043	0.047	0.053	0.051	0.056
冷浑浊	+++	++	+	+	+	++
强化后浊度	0.587	0.400	0.289	0.29	0.304	0.503
乙醇浊度测定	0.599	0.410	0.312	0.302	0.306	0.565

分析表4与表5数据可知,加入酸性蛋白酶的酒样,原始浊度总的趋势是随着酶量的增加而增加,没加酶的酒样原始浊度最低。这种情况主要是由于加入酸性蛋白酶使酒体内的固形物增多造成的。从冷浑浊、强化试验、乙醇浊度试验3种方法检测数据可知,添加10、15、20 U/g酸性蛋白酶酿成的酒样浊度相对都低。所以酸性蛋白酶的加入量在10~20 U/g

较为适宜。不同时间段添加蛋白酶量,反映出相同的规律。这说明在投料时加入与前酵后加入,对酒样的非生物稳定性影响不大,这可能是由于养醅时间较长,酸性蛋白酶有充分的反应时间,而生产中实际酿造时间与之相比要短一些,因此投料时加入酸性蛋白酶效果更好。

### 3 小结

酸性蛋白酶添加过量易使黄酒醪酸败。酸性蛋白酶加入 50U/g,开头耙温度 36℃,结果不到 8 d 发酵醪就酸败了,酸度大于 8.5g/L,经镜检后发现杆菌大量出现,而酵母数只有 0.5 亿/mL。这有可能是因为发酵温度过高,来不及散热,使酵母衰败过速。在减少酶量的同时也降低了开耙温度,温度为 33℃ 开头耙。这样发酵醪没有整批酸败的现象发生。由于开头耙的温度比大生产的低 2%~3%。投料时加入酸性蛋白酶与前发酵 5 d 后加入酸性蛋白酶到发酵结束时两者理化指标的差别不大,总的来说酒精度、酸度、氨基酸态氮、非糖固形物生成量与加入酸性蛋白酶的量成正比,对氨基酸态氮的影响最明显。通过冷混浊与强化试验发现加入 10~20 U/g 的蛋白酶的强化浊度比原酒降低了 0.3 左右,冷混浊的沉淀量比原酒明显减少。这说明黄酒的稳定性有一定提高。通过发酵的不同时期加入相同量的酸性蛋白酶对黄酒稳定性没有多大的影响,但从黄酒的理化指标数据分析可知,投料时与前发酵后不同时间加入酸性蛋白

酶对非糖固形物有影响。根据生产的实际情况,在投料时加入与前酵后(发酵 5 d 后)加入两者相比只要控制好温度还是在投料时加入比较好,本次课题的研究目的是黄酒的稳定性,所以从本次黄酒稳定性试验结果可知在发酵时加入酸性蛋白酶添加量在 10~20 U/g 之间比较合适,结合试验数据与企业的经济成本两方面考虑,选用 15U/g 的酸性蛋白酶为最好。

### 参 考 文 献

- [1] Ferreira, Ricardo B; Picarra-Pereira, Maria A. Monteiro, Sara, Loureiro, Virgilio B, et al. The wine proteins, Trends in Food Science and Technology[J], 2001, (7): 230-233.
- [2] Siebert K J. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze stabilization and analysis[J]. J. Agri. Food. Chem. 1999, 47(2): 353-362
- [3] 白树雄. 木瓜蛋白酶在啤酒生产中的应用试验[J]. 广西轻工业, 1997(1): 37-38.
- [4] 顾国贤. 酿造酒工艺(第2版)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996.
- [5] GB/T13662-2008. 黄酒[S].
- [6] 钱俊青, 蒋同隼, 徐国明. 吸附法提高黄酒稳定性的研究[J]. 中国酿造, 1997(1): 25-29.
- [7] 蔡小云, 林峰, 邹慧君, 等. 一种快速判断黄酒酒体非生物稳定性的新技术[J]. 中国酿造, 2008(9): 102-105.
- [8] 魏炜, 张洪渊. 酸性蛋白酶的性质及其在白酒酿造中的作用[J]. 酿酒科技, 1997(6): 18-20.
- [9] 郑东宝. 食品酶学[M]. 南京: 东南大学出版社, 2006: 144.

## Adding acid protease on the stability of Chinese rice wine fermentation mash

WEI Tao-ying<sup>1</sup>, WANG Zhao<sup>2</sup>, WEI Rui-feng<sup>1</sup>

1 (Zhejiang Industry Polytechnic College, Shaoxing 312000, China)

2 (Zhejiang University of Technology, Hangzhou 31000, China)

**ABSTRACT** In order to improve the stability of acid protease Chinese rice wine, adding different amounts of first of different fermentation stage, through the analysis of the Chinese rice wine wine, sugar, acid, aa-N test, the test results show that: the generation and join their protease is directly proportional to the volume, the most obvious effect on aa-N. Through the cold turbid and intensifying test, found that adding 10~20 U/g protease Chinese rice wine turbidity than the blank wine is reduced by about 0.3, cold turbid precipitation obviously decreased than wine. This shows that the addition of protease can improve the stability of rice wine during fermentation. Acid protease in different period of fermentation by adding the same amount of physicochemical properties of rice wine, rice wine stability do not have much impact on the economy, combined with the test data and the enterprise two aspects, acidic protease 15 U/g is selected as the best.

**Key words** Chinese rice wine; acid protease; stability